

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 5/08, 5/10, 14/68, A61K 38/04, 7/06		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/12212
			(43) Date de publication internationale: 26 mars 1998 (26.03.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01669		(81) Etats désignés: AU, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 23 septembre 1997 (23.09.97)			
(30) Données relatives à la priorité: 96/11556 23 septembre 1996 (23.09.96) FR		Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avec revendications modifiées.	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOCIETE D'ETUDE ET DE RECHERCHE DE PATHOLOGIE APPLIQUEE - SERPA [FR/FR]; Tech Village 2, Villa Missouri, 18, avenue de l'Europe, F-31520 Ramonville St. Agne (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DUSSOURD D'HINTERLAND, Lucien [FR/FR]; 10, rue Pierre Benoît, F-31400 Toulouse (FR). PINEL, Anne-Marie [FR/FR]; La Grande Motte, 771, rue des Navigateurs, F-34280 La Grande Motte (FR).			
(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			
(54) Title: NUCLEOPEPTIDE COMPLEXES, COSMETIC AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM AND THEIR USES			
(54) Titre: COMPLEXES NUCLEO-PEPTIDIQUES, COMPOSITIONS COSMETOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT ET UTILISATIONS			
(57) Abstract			
<p>The invention concerns nucleopeptide complexes obtained by synthesis, comprising a sequence of at least three amino acids in the form of D, L or DL, said sequence being chemically or physically bound with xanthic acids, or their derivatives of general formula I: N-R1 - COOH, in which N represents one purine base containing 5 to 10 carbon atoms, R1 represents one C₁ or C₃ alkyl radical.</p>			
(57) Abrégé			
<p>L'invention concerne des complexes nucléo-peptidiques obtenus par synthèse, comprenant une séquence d'au moins trois acides aminés sous la forme D, L ou DL, ladite séquence étant liée physiquement ou chimiquement à des acides puriques, ou leurs dérivés de la formule générale (I): N-R1 - COOH, dans laquelle N représente une base purique comprenant de 5 à 10 atomes de carbone, R1 représente un radical alkyl en C₁ ou C₃.</p>			
BEST AVAILABLE COPY			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

COMPLEXES NUCLEOPEPTIDIQUES, COMPOSITIONS COSMETOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT ET UTILISATIONS

La présente invention a pour objet des complexes moléculaires nucléo-peptidiques obtenus par synthèse chimique, sous forme de conjugués peptidiques, 5 liés physiquement ou chimiquement à des acides puriques en particulier des acides xanthiques et leurs dérivés.

L'activité physiologique des nucléo-peptides faisant l'objet et de la présente invention est préférentiellement orientée vers la synthèse et la stimulation des mélanines épidermiques et leur dispersion au niveau des couches superficielles 10 de la peau - assurant ainsi une mélanisation très large de l'épiderme et une protection de haut niveau contre les "érythèmes" induits par les radiations solaires (UVA-UVB).

Il est connu de l'homme de l'art, que le rôle des pigments mélanocytaires, sécrétés par les cellules de l'épiderme humain "les mélanocytes", ainsi que leur 15 dispersion au niveau des cellules kératinocytaires de la peau, a pour fonction physiologique essentielle la protection du derme, de l'épiderme et du système immunitaire cutané contre les radiations solaires, en particulier les UVA et UVB.

Il est également connu que le système mélanocytaire humain (coloration de la peau, cheveux, etc...) fonctionne de façon différente de celui des animaux. En 20 particulier la sécrétion des mélanines par les mélanocytes et la dispersion de ces mélanines en surface de l'épiderme exige chez l'homme une coopération cellulaire entre les mélanocytes et les kératinocytes, qui s'exprime par un nombre défini de mélanocytes pour un kératinocyte, formant ainsi une entité physiologique fonctionnelle appelée "Epidermal Melanin Unit" spécifique de chaque type racial. 25 "Dubertret L. et coll., J. Invest. Dermatol. (8) suppl. 2s-IOs-1983 - Dubertret L. et coll. J. Invest. Dermatol. 0022-202X-1986 - TB Fitzpatrick, G. Szabo, Michael M. Wick, Biochemistry and Physiology of Melanin Pigmentation 687, vol. II, Lowell A. Goldsmith, 1991 - Jimbow K, Uesugi T (1992), J. Invest. Dermato. 78-108-115, Lerch K. (1988) Avances in Pigment Cell Research 85-88".

30 L'activité du système mélanocytaire est sous la dépendance de facteurs physiologiques tels que les hormones peptidiques, les facteurs de croissance, et en particulier, les facteurs d'induction et d'activation de la tyrosinase mélanocytaire et l'AMP cyclique Protéine Kinase dépendante.

Il est connu de l'homme de l'art que le métabolisme cellulaire 35 des peptides, hormonaux ou non (neurotransmetteurs ou médiateurs), est sous la dépendance du cycle cellulaire de l'AMP cyclique appelé 2ème messenger hormonal dont le rôle est d'amplifier la réponse cellulaire induite par un

facteur peptidique spécifique (Rall et al. J. Biol. Chem. 224-463 (1957), Sutherland, Rall. IBID 232-1077 (1958)).

Il a été également démontré que certaines substances sont capables de potentialiser fortement l'action de l'AMP cyclique prolongeant ainsi la stimulation de la Tyrosinase dans le métabolisme intracellulaire de la mélanogénèse.

Parmi ces substances figurent des analogues de l'AMP cyclique tels que le dibutyryl AMPc, les prostaglandines E1 et en particulier les dérivés xanthiques (Halaban R, Pomerantz SH, Marshal S., Lambert DT et Lerner AB, J. Cell. Biol. 97, 480-488 (1983) ; Kowichi, Jimbow, Thomas B. Fitzpatrick Mick, M. Wick Biochemistry and Physiology of Melanin Pigmentation Oxford U. Press (1991)).

Un des objets de la présente invention concerne des complexes moléculaires sous forme de nucléo-peptides comprenant des conjugués peptidiques mélanotropes, inducteurs spécifiques de mélanogénèse cellulaire, liés chimiquement à des acides puriques ou leurs dérivés, de préférence à des acides xanthiques, stimulant la Tyrosinase mélanosomale par activation de l'AMP cyclique (2ème messenger) dont le rôle est d'amplifier l'activité des systèmes cellulaires mélanocytaires, et en particulier la dispersion des mélanines au niveau des kératinocytes par activation des facteurs de croissance.

Parmi les complexes peptidiques composant les nucléo-peptides selon l'invention, figurent préférentiellement des peptides comprenant une séquence d'au moins 3 acides aminés, lesdits acides aminés étant sous forme D, L ou DL, c'est-à-dire naturelle ou non.

Ladite séquence est associée ou liée chimiquement ou physiquement, sous forme de sels, d'esters ou d'amides, à des acides puriques ou leurs dérivés de formule générale I :



dans laquelle N représente une base purique comprenant de 5 à 10 atomes de carbone, R1 représente un radical alkyl en C₁ ou C₃.

Les acides de formule générale (I) sont choisis parmi les acides puriques ou dérivant des purines pour lesquels R1 représente un radical alkyl en C₁ ou C₃, et sont de préférence choisis parmi :

- l'acide hypoxanthique (C₇H₅N₄O₃),
- l'acide acétyl xanthique (C₇H₈N₄O₄),

- l'acide théobromine acétique ($C_9H_8N_4O_4$), et
- l'acide théophylline acétique ($C_9H_{11}N_4O_4$).

Les complexes peptidiques de l'invention comprennent de préférence une séquence de 3 acides aminés, en particulier l'une des séquences suivantes :

Ala-His-HPhé

His-HPhé-Arg

dans laquelle Hphé représente la dihydroxy-DPhénylalanine ou la DhomoPhénylalanine.

10 D'une manière générale, les complexes peptidiques selon l'invention répondent à la formule générale :

AX-His-HPhé-Y

dans laquelle :

A est un acide purique de formule générale (I) telle que définie ci-dessus ;

15 X représente un groupe Norleucine (Nle), ou l'un de ses dérivés sous forme acétylée (Acyl-Nle) ou méthylée (MeNle), le groupe Nle-Ala ou Ala ;

Y représente un groupe ArgZ ou Z dans lequel Z est Trp-Gly-OH, Trp-OH, OH, Trp-Gly-NH₂, Trp-NH₂ ou NH₂ ;

Hphé représente la dihydroxy-DPhénylalanine ou la DhomoPhénylalanine.

20 La présente invention concerne plus particulièrement les dérivés peptidiques suivants :

1) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-Arg-Trp-Gly-NH₂

2) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-Arg-Trp-NH₂

3) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-Arg-NH₂

25 4) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-NH₂

5) A-Ala-His-DhomoPhé-NH₂

6) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-Arg-Trp-Gly-OH

7) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-Arg-Trp-OH

8) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-Arg-OH

30 9) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-OH

10) A-Ala-His-DhomoPhé-OH

11) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-Arg-Trp-Gly-NH₂

12) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-Arg-Trp-NH₂

13) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-Arg-NH₂

35 14) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-NH₂

- 15) A-Ala-His-DihydroxyDPhé-NH₂
16) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-Arg-Trp-Gly-OH
17) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-Arg-Trp-OH
18) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-Arg-OH
19) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-OH
20) A-Ala-His-DihydroxyDPhé-OH.

Il est également possible que certains de ces acides aminés comportent des fonctions de glycosylation.

Il doit être entendu que la présente invention concerne l'ensemble de ces structures comprises dans la présente description.

La présente invention concerne également des compositions galéniques, pharmaceutiques ou cosmétologiques comprenant, en tant que substance active, au moins un complexe nucléo-peptidique tel que défini précédemment, en association avec un support pharmaceutiquement ou cosmétologiquement acceptable.

Ces compositions peuvent être réalisées sous forme d'émulsion, de crème, de spray, de solution, de lotion ou de gel, et comporter des excipients connus ainsi qu'éventuellement d'autres principes actifs.

La présente invention comprend avantageusement des préparations à usage pharmaceutique, utilisables par voie injectable ou par voie topique, pour le traitement médical des troubles de la mélanogénèse, il s'agit de préférence des conjugués peptidiques avec des acides carboxyliques.

Elle a également pour objet des compositions cosmétologiques et/ou capillaires utilisées sous forme de solutions, de lotions, de sprays ou de crèmes ou de gels, utilisées comme activateur de la mélanogénèse cutanée, en l'absence de tout phénomène d'érythème, protégeant ainsi l'épiderme contre les traumatismes induits par les radiations solaires (UV). Les compositions cosmétologiques conformes à la présente invention peuvent également être utilisées pour le traitement préventif et curatif des érythèmes solaires.

L'invention sera mieux comprise au vu des exemples suivants qui ne sont donnés qu'à titre purement illustratif.

Exemple 1 : Synthèse du Peptide N° 1 - Code M1

A = Acétyl Xanthique

MW = 211,11

M1 = Peptide 1 = Nle - Ala - His - DhomoPhé - Arg - Trp - Gly - NH₂

Les synthèses des complexes peptidiques selon l'invention ont été réalisées selon les techniques de Merrifield adaptées aux différentes structures peptidiques des complexes faisant l'objet de l'invention.

Le principe général de la technique de Merrifield étant connu de l'homme de l'art, seules les phases spécifiques de chaque séquence peptidique seront décrites.

D'une façon générale, on utilise une résine MBHA, comme groupement protecteur : les dérivés FMOC (Fluoroényl, Méthoxy Carbonyl), et comme agent de couplage : le BOP.

Les acides aminés utilisés sous forme de dérivés FMOC sont les suivants dans l'ordre progressif : FMOC-Gly-OH, Trp-OH, Arg-OH, DhomoPhé-OH, His-OH, Ala-OH et Nle-OH.

Chaque acide aminé est utilisé en excès, ainsi que le BOP et les couplages répétés deux fois.

L'acide acétyl xanthique est couplé de façon similaire.

La déprotection est effectuée en deux phases :

1 - Acide trifluoroacétique,

2 - Acide fluorhydrique anhydre/para-crésol.

Le composé obtenu avec un rendement de 75 % est repris dans l'acide acétique à 95,5 % et desséché par lyophilisation.

Le conjugué N° 1 est obtenu avec un rendement de 82 % de pureté HPLC.

100 mg de ce conjugué sont à nouveau purifiés par HPLC sur colonne C18 et l'on obtient 70 mg de produit pur.

Analytique

Temps de rétention : 17 min, colonne C18, UV 210 nm, solvant : tampon de phosphate triéthylamine, acétonitrile.

Acides aminés : Ala - 1 ; Gly 1,01 ; His - 1,00 ; Arg - 0,94 ; Dh.Phé - 1,03.

Spectre de masse (FAB+) 1075.

Exemple 2 : Synthèse du Peptide N° 2 - Code M2

A = Acide Théophyline acétique ($C_9H_{11}N_4O_4$)

M2 = MeNle-Ala-His-DhomoPhé-Arg-Trp-NH₂

En opérant selon les techniques de Merrifield de l'exemple N° 1, on obtient le peptide M2 après traitement par HPLC avec un rendement de 65 %.

Analytique

MW = 1036

HPLC = 98 % - Nucléosil C18 - 250

Acides aminés : MeNle = ++, His = 1,03/1, Arg = 1,01/1, Ala = 0,96/1,
5 Dh-Phé = 1,05.

++ = MeNle = détecté.

Exemple 3 : Synthèse du Peptide N° 4 - Code M4A = Acide acétique CH_3COOH

10 MW = 60,05

M4 = Nle - Ala - His - DHomo-Phé - NH_2 .

En opérant selon les techniques décrites précédemment dans
l'exemple N° 1, on obtient le peptide N° 4.

Analytique

15 MW = 645

HPLC = 95 % - Nucléosil C18 - 244

Acides aminés : Nle = ++, His = 1,03/1, Arg = 1,01/1, Ala = 0,96/1, Dh-
Phé = 1,05.

++ = Nle = détecté.

20

Exemple 4 : Synthèse du Peptide N° 3 - Code M3A = acide Théobromoacétique ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_4$)M3 = Nle-Ala-His-DhomoPhé-Arg- NH_2

25 L'acide Théobromoacétique est salifié avec le peptide. En opérant
selon les techniques décrites précédemment dans l'exemple N° 1, on obtient
le peptide N° 3.

Analytique

MW Peptide = 745

MW Théobromoacétique = 238,20

30 « 3,7 diméthyl purine acétique »

HPLC Peptide = 95 %

Nucléosil C18 - 244

Acides aminés : His = 1,05, Arg = 1/1,02, Ala = 0,96, HydroxyDh-Phé =
1,18.

35

Nle = détecté.

Exemple 5 : Etude in vitro de l'activité du Peptide M1 sur la stimulation de la Mélanine et de la Tyrosinase, sur Mélanocytes en culture comparativement à l' α MSH

5. • MATÉRIEL

1. Peptide M1

PM = 1075

10^{-7} M; 10^{-9} M; 10^{-11} M

2. α MSH - Sigma

10 10^{-7} M

3. Mélanocytes de Cloudman - Clone M3.

• MÉTHODE

15 Cultures de Mélanocytes en présence des solutions de Peptide M1, et de l' α MSH comme témoin culture sous 5 % de CO_2 dans milieu de Ham F.10 supplémenté en sérum de cheval (15 %) et SVF (2, 5 %) en présence de Pénicilline-Streptomycine.

• DOSAGES

- 20 = Dosage de la Mélanine selon Abdel Malek à 436 nm.
= Dosage de la Tyrosinase/Ldopa à 475 nm.
= Dosage des Protéines selon technique de Lowry.

• RÉSULTATS = Dosages de la Mélanine

25 Le peptide M1 provoque une augmentation du taux de Mélanine de 92 % à la dilution de 10^{-7} M, et l' α MSH provoque une augmentation de la Mélanine de 11 % à la dilution de 10^{-7} M.

• RÉSULTATS = Dosages de la Tyrosinase

30

% d'augmentation de Mélanine et de Tyrosinase :

	α MSH 10^{-7} M	M1 10^{-7} M	M1 10^{-9} M	M1 10^{-11} M
35 Mélanine	11 %	92 %	80 %	51 %
Tyrosinase	28 %	30 %	58 %	90 %

- COMMENTAIRES

- I - Mélanocytes de Cloudman

Mélanocytes du Mélanome Murin de Cloudman, dont la propriété est de sécréter naturellement de la Tyrosinase et de la Mélanine.

5 L'utilisation du Mélanome de Cloudman pour l'étude en screening primaire des substances mélanotropes, réside dans la réponse exponentielle de ce modèle expérimental, qui permet de différencier les activités des peptides mélanotropes dont les structures sont relativement proches.

- II - Relations doses/effets des peptides mélanotropes

10 Dans le modèle expérimental par cultures monocellulaires, la réponse des peptides dépend de l'encombrement des récepteurs cellulaires qui répondent de façon plus intense, à des doses faibles et filées.

Par ailleurs, on observe un décalage entre la réponse mélanotrope optimale du peptide M1 aux doses de 10^{-7} M et 10^{-9} M, et la réponse de la 15 synthèse de la Tyrosinase, qui atteint son optimum à 10^{-11} .

Ce phénomène s'explique par la libération de la Mélanine stockée dans les mélanosomes, alors que la synthèse de la Tyrosinase est induite après cette libération, pour compenser la sécrétion de Mélanine.

Par ailleurs, il faut tenir compte du poids moléculaire des peptides 20 testés comparativement au poids moléculaire de l' α MSH témoin.

Par exemple, l' α MSH à 10^{-7} M indépendamment de son action ubiquitaire, n'est pas utilisable en thérapeutique compte tenu du prix de revient élevé de sa synthèse qui comprend 14 étapes, alors que le peptide M1 n'en comprend que 7 à la même puissance 10^{-7} M pour une activité 9 fois plus 25 intense.

Exemple 6 : Etude in vitro de la synthèse de la Tyrosinase induite dans les mélanocytes en culture par le peptide M3 Mélanocytes humains clone M4Be 30 INSERM U. 436

- MATÉRIEL

- 1. Peptide M3

PM = 745

35 Employé aux dilutions de 10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-11} M dans H_2O .

2. Peptide témoin de référence α MSH Sigma employé à la dilution de 10^{-7} M dans H_2O .

3. Mélanocytes humains clone M4Be - INSERM U.436.

4. Les Mélanocytes M4Be sont des cellules tumorales provenant de l'Unité U 436/218 de l'INSERM de Lyon. Ces cellules sont caractérisées par leur
5 déficience en Tyrosinase (syndrome de Menkes).

Elles représentent un modèle expérimental permettant d'apprécier l'activité des peptides, sur la synthèse de la Tyrosinase chez des sujets génétiquement déficients.

10

Culture

Témoin α MSH Lot 085H12461

Peptide M3

Cellules :

15

- Type : S91 CD

- N° passage : 21

- Inoculation, date : 72

- Inoculation, quantité : 1×10^5 /puits, 3 plaques 6 puits

Milieu :

20

Ham F10 + (10 % Sch, 2 % SVF, Pénic-Strepto (100U-100 μ g/ml)).

Contact produit (100 μ l + 0,9 ml milieu) :

- Durée : 24 heures

- Rinçage : 2

Récupération cellules après : 24h

25

Dosages

Dosage de la Tyrosinase Ldopa à 475 nm.

Dosage des Protéines selon la technique de Lowry.

30

• RÉSULTATS

Dosage de l'activité tyrosine oxydase et des protéines
au niveau de mélanocytes cultivés en présence d' α -MSH ou du peptide M3

Produit	Tyrosinase U/ml	Protéines μ g/ml	Tyros./Prot. $\times 1000$	Moyenne Tyros./prot.	Ecart-Type Tyros./prot.	Stimulation en %
Témoin	0,178 0,190 0,165	48,4 47,2 48,8	3,68 4,03 3,38	3,70	0,26	/
MSH (10^{-9} M)	0,225 0,237 0,206	48,91 47,12 48,70	4,60 5,03 4,23	4,63	0,54	25
10^{-5} M	0,287 0,262 0,266	66,6 66,0 60,3	4,31 3,97 4,41	4,23	0,19	15
10^{-7} M	0,270 0,245 0,254	53,9 56,8 54,3	5,01 4,31 4,68	4,67	0,28	27
M3 10^{-9} M	0,304 0,329 0,371	46,3 48,4 44,2	6,57 6,80 8,39	7,25	0,81	96
10^{-11} M	0,296 0,207 0,224	66,9 49,7 52,2	4,42 4,16 4,29	4,29	0,11	16
10^{-12} M	0,241 0,254 0,283	57,0 62,1 69,5	4,23 4,09 4,07	4,13	0,07	12

Dosages de la Tyrosinase

Le peptide M3 stimule la sécrétion de la Tyrosinase de 96 % à la dose de 10^{-9} M, comparativement aux témoins non traités et à l' α MSH à la dose de 10^{-9} M.

5

Exemple 9 : Etude du pouvoir préventif des Peptides M2 contre l'érythème solaire

Objectif :

Evaluer le pouvoir protecteur du Peptide M2 en application topique, contre l'érythème solaire.

10

• MATÉRIELS

1. Peptide M2 en solution à 50 mg/l et 100 mg/l dans un gel de PEG.
2. Cobayes mâles « Dunkin-Hartley » de 300 g, 10 animaux par lot.

15

• MÉTHODE

Epilation des flancs des animaux à J-1, un côté reçoit le traitement, l'autre sert de témoin. Les animaux sont recouverts de papier métallique percé de 4 fenêtres au niveau des flancs. On applique sur un côté 1 ml de Gel de chacune des solutions de peptide M2:

20

Après application, on expose les animaux à un rayonnement UVA et UVB délivrant $10,75 \text{ W/cm}^2$, chaque fenêtre étant soumise à une exposition de durée croissante en progression géométrique de 1,25.

Après 24 heures, on évalue le niveau d'érythème de chaque

25

• RÉSULTATS

Pour chaque animal, on évalue le temps d'irradiation provoquant le premier érythème net (DEM). On calcule ensuite les rapports de DEM (zone traitée/zone non traitée).

30

La moyenne de ces rapports constitue l'indice d'élévation du seuil d'érythème pour chaque dose.

Traitements	Gammes de temps d'irradiation	DEM moyennes	Indices d'élévations du seuil érythémal	
			Moyenne	Ecart-type
Témoins non traités	60 à 117 s	83,95		
M2 50 mg/l	240 à 468 s	324,40	3,96	0,66
M2 100 mg/l	360 à 702 s	495,6	5,94	0,99

10 • CONCLUSION

L'application du peptide M2 par voie topique prévient de façon hautement significative l'apparition de l'érythème solaire.

En effet, des expositions 6 fois (pour 100 mg/l) et 4 fois (pour 50 mg/l) plus longues sont nécessaires pour donner un érythème équivalent à celui observé sur la partie non traitée.

Aucun signe d'intolérance n'a été observé sur les zones ayant reçu M2 puis exposées aux rayons UV.

Exemple 10 : Etude clinique d'objectivation de l'activité comparative de deux formules galéniques de la série peptidique « MELITANE »

• RÉSUMÉ

Etudier comparativement l'action mélanotrope et anti-érythémateuse de deux formules galéniques de peptides de la série MELITANE, en application topique.

• MATÉRIEL

Formule N° 10 = A-Peptide N° 4

Acyl-MeNle-Ala-His-DhomoPhé-NH₂

Formule N° 11 = A-Peptide N° 3

3,7 - diméthyl purine acétique-Nle-Ala-His-DhomoPhé-Arg-NH₂

Forme Galénique = gel de carboxyméthyl cellulose à 5 mg de peptide pour 100 g de gel.

• MÉTHODOLOGIE

L'analyse des résultats a porté sur un panel de 25 volontaires adultes de deux sexes, âgés de 18 à 50 ans.

Les produits étudiés ont été appliqués quotidiennement, deux fois par jour, sur la face de flexion des avant-bras (un seul produit par avant-bras) pendant deux semaines consécutives.

L'analyse statistique a porté d'une part, sur les valeurs obtenues au niveau de chacune des zones traitées en comparaison aux valeurs obtenues au niveau de la zone témoin et d'autre part, sur les différences calculées entre les valeurs obtenues sur chacune des zones traitées ou témoin de la valeur obtenue sur la zone témoin propre à chacune des différentes zones, afin de comparer les deux produits étudiés à la zone témoin.

Les moyennes des différences des coordonnées de chromaticité ont été également calculées pour l'ensemble de chacune des zones traitées et témoin.

Une analyse de variance et le test de la différence la moins significative (« L.S.D. ») ont également permis d'effectuer les comparaisons multiples entre les valeurs obtenues au niveau de chacune des zones traitées et témoin.

Les valeurs moyennes et les écarts obtenus par rapport à la moyenne (S.E.M.) des Doses Erythémateuses Minimales (D.E.M.), obtenues sur l'ensemble des volontaires, pour chacun des produits étudiés, sont répertoriées dans le tableau I. Les différences statistiques y sont également mentionnées, ainsi que le type de test effectué.

Les valeurs moyennes et les écarts obtenus par rapport à la moyenne (S.E.M.) des différences de la coordonnée de chromaticité « b* » et de l'Angle Typologique Individuel (ITA°), obtenues sur l'ensemble des volontaires ayant participé à l'essai, pour chacun des produits étudiés, sont répertoriées dans les tableaux II, III, IV et V. Les différences statistiques y sont également mentionnées, ainsi que le type de test effectué.

L'Angle Typologique Individuel ITA°, défini par Chardon & Col. pour déterminer le niveau de mélanisation de la peau, a été calculé de la façon suivante :

$$ITA^{\circ} = (\text{arc tangente } (L^*-50)/b^*) \cdot 180/3.14159$$

avec : L* = variable de clarté et b* = coordonnée de chromaticité du bleu au jaune.

TABLEAU I
DOSES ERYTHEMATEUSES MINIMALES APRES UNE EXPOSITION
AUX UV A ET B
(moyennes et S.E.M., n = 25)

5

ZONES	DOSE EN J/cm ²		
	TEMOIN	PRODUIT 10	PRODUIT 11
T 24 heures	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,1*	2,5 ± 0,1*

10

- * : valeur statistiquement significative par rapport à la valeur obtenue au niveau de la zone témoin, au même temps de l'étude (test « t » de Student en séries non appariées, « one-tail », significativité : p < 0,05).
- ° : valeur statistiquement significative par rapport à la valeur obtenue au niveau de l'autre zone traitée, au même temps de l'étude (L.S.D. et test « t » de Student en séries appariées, « onetail », significativité : p < 0,05).

15

20

TABLEAU II
VARIATION DE LA COORDONNEE DE CHROMATICITE « b* »
APRES EXPOSITION SOLAIRE AUX UV A ET B
T72 Heures

(moyennes et S.E.M., n = 25)

25

Zones	Δb*		
	TEMOIN	PRODUIT 10	PRODUIT 11
FLUX en med/min/cm ²			
0,82	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2
1,02	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,2
1,28	0,3 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,6 ± 0,2
1,60	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,9 ± 0,2
2,00	0,4 ± 0,1	2,1 ± 0,2	2,6 ± 0,2
2,50	0,5 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,9 ± 0,2
MOYENNE	0,4 ± 0,1	1,5 ± 0,2*	1,8 ± 0,2*

30

35

* : différence statistiquement significative par rapport à la valeur obtenue au niveau de l'autre zone traitée, pour le même flux (ANOVA et L.S.D., significativité : $p < 0,05$).

° : différence statistiquement significative par rapport à la valeur obtenue au niveau de la zone témoin, pour le même flux (test «t» de Student en séries appariées, « one-tail », significativité : $p < 0,05$).

TABLEAU III
VARIATION DE L'I.T.A.* APRES EXPOSITION SOLAIRE AUX UV A ET B
T24 Heures
(moyennes et S.E.M., $n = 25$)

Zones	Δ I. T. A.		
	TEMOIN	PRODUIT 10	PRODUIT 11
FLUX en Med/min/cm ²			
0,82	- 1,5 \pm 0,3	- 2,8 \pm 0,6	- 3,6 \pm 0,5
1,02	- 1,9 \pm 0,7	- 4,7 \pm 0,6	- 5,8 \pm 0,7
1,28	- 1,5 \pm 0,6	- 4,9 \pm 0,5	- 5,8 \pm 0,6
1,60	- 1,7 \pm 0,6	- 5,5 \pm 0,7	- 7,0 \pm 0,7
2,00	- 1,9 \pm 0,7	- 6,8 \pm 0,8	- 7,5 \pm 0,9
2,50	- 2 \pm 0,7	- 7,5 \pm 1,0	- 8 \pm 0,9
MOYENNE	- 1,75 \pm 0,6	- 5,37 \pm 0,7*	- 6,29 \pm 0,72*

* : différence statistiquement significative par rapport à la valeur obtenue au niveau de l'autre zone traitée, pour le même flux (ANOVA et L.S.D., significativité : $p < 0,05$).

° : différence statistiquement significative par rapport à la valeur obtenue au niveau de la zone témoin, pour le même flux (test «t» de Student en séries appariées, « one-tail », significativité : $p < 0,05$).

TABLEAU IV
VARIATION DE L'I.T.A.* APRES EXPOSITION SOLAIRE AUX UV A ET B
T72 Heures
 (moyennes et S.E.M., n = 25)

5

10	Zones	Δ I. T. A.*		
	FLUX en Med/min/cm ²	TEMOIN	PRODUIT 10	PRODUIT 11
	0,82	- 1 \pm 0,4	- 2,5 \pm 0,6	- 3 \pm 0,7
	1,02	- 1 \pm 0,5	- 3,3 \pm 0,6	- 5 \pm 0,8
	1,28	- 1 \pm 0,5	- 4,4 \pm 0,7	- 6 \pm 1,0
	1,60	- 2 \pm 0,5	- 5,5 \pm 0,9	- 7 \pm 0,8
15	2,00	- 2 \pm 0,6	- 7,9 \pm 0,8	- 8 \pm 0,9
	2,50	- 3 \pm 0,5	- 8,1 \pm 0,9	- 10 \pm 0,7
	MOYENNE	- 1,66 \pm 0,5	- 5,29 \pm 0,75**	- 6,5 \pm 0,82**

20 * : différence statistiquement significative par rapport à la valeur obtenue au niveau de l'autre zone traitée, pour le même flux (ANOVA et L.S.D., significativité : p < 0,05).

* : différence statistiquement significative par rapport à la valeur obtenue au niveau de la zone témoin, pour le même flux (test «t» de Student en séries appariées, « one-tail », significativité : p < 0,05).

25

TABLEAU V
VARIATION DE LA COORDONNEE DE CHROMATICITE «b*» et de
l'I.T.A.*

AU TEMPS DE 72 Heures

(moyennes et S.E.M., n = 25)

5

DOSE EQUIVALENTE A 0,75 D.E.M.			
PARAMETRE	TEMOIN	PRODUIT 10	PRODUIT 11
10 Δb	0,5 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1**	3,8 \pm 0,2**
Δ I. T. A.*	- 2,2 \pm 0,4	- 3,5 \pm 0,4**	- 4,9 \pm 0,6**
DOSE EQUIVALENTE A 1 D.E.M.			
PARAMETRE	TEMOIN	PRODUIT 10	PRODUIT 11
15 Δb	0,6 \pm 0,1	1,7 \pm 0,2**	2,9 \pm 0,2**
Δ I. T. A.*	- 1,6 \pm 0,5	- 2,9 \pm 0,6**	- 3,4 \pm 0,6**
DOSE EQUIVALENTE A 1,25 D.E.M.			
PARAMETRE	TEMOIN	PRODUIT 10	PRODUIT 11
20 Δb	0,8 \pm 0,1	1,9 \pm 0,2**	2,6 \pm 0,2**
Δ I. T. A.*	- 3,8 \pm 0,6	- 2,6 \pm 0,7**	- 1,5 \pm 0,6**

25 * : valeur statistiquement significative par rapport à la valeur obtenue au niveau de la zone témoin, au même temps de l'étude (test «t» de Student en séries appariées, « one-tail », significativité : p < 0,05).

* : valeur statistiquement significative par rapport à la valeur obtenue au niveau de l'autre zone traitée, au même temps de l'étude (ANOVA et L.S.D., significativité : p < 0,05).

30 • RÉSULTATS

Les applications topiques des produits «formule 10 et formule 11» pendant 15 jours consécutifs et dans les conditions expérimentales définies par le protocole ont donné les résultats suivants :

- 35 1. Augmentation hautement significative sur le plan statistique de la dose érythémateuse minimale chez le volontaire adulte, exprimant une activité anti-érythémateuse hautement significative en particulier pour la formule 11.

2. On observe également pour l'ensemble des panélistes une augmentation statistiquement significative des indices de chromaticité traduisant une élévation de haut niveau du degré de mélanisation de la peau après exposition solaire unique aux UV A et B.
5. 3. La diminution hautement significative de l'I.T.A. confirme également l'intensité de mélanisation de la peau particulièrement marquée pour la formule 11.

REVENDICATIONS

- 1/ Complexes nucléo-peptidiques obtenus par synthèse, comprenant une séquence d'au moins trois acides aminés sous la forme D, L ou DL, ladite séquence étant liée physiquement ou chimiquement à des acides puriques, ou leurs dérivés de formule générale I :



dans laquelle N représente une base purique comprenant de 5 à 10 atomes de carbone, R1 représente un radical alkyl en C₁ ou C₃.

- 2/ Complexes nucléo-peptidiques selon la revendication 1, caractérisés en ce que les dérivés des acides puriques sont des acides xanthiques.

- 3/ Complexes nucléo-peptidiques selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce que la séquence d'acides aminés est liée à l'acide sous forme de sel, d'ester ou d'amide.

- 4/ Complexes nucléo-peptidiques selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que les acides puriques sont choisis dans le groupe comprenant :

- l'acide hypoxanthique (C₇H₅N₄O₃)
- l'acide acétyl xanthique (C₇H₈N₄O₄)
- l'acide théobromine acétique (C₉H₈N₄O₄)
- l'acide théophylline acétique (C₉H₁₁N₄O₄).

- 5/ Complexes nucléo-peptidiques selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisés en ce que la séquence est constituée de 3 acides aminés, et est choisie dans le groupe comprenant :

Ala-His-HPhé

His-HPhé-Arg

où Hphé représente la dihydroxy-DPhénylalanine, la DhomoPhénylalanine.

- 6/ Complexes nucléo-peptidiques selon la revendication 5, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule générale :

AX-His-HPhé-Y

dans laquelle

A est un acide purique de formule générale I telle que définie ci-dessus ;

X représente un groupe Norleucine (Nle), ou l'un de ses dérivés sous forme cétylee (Acyl-Nle) ou méthylée (MeNle), le groupe Nle-Ala ou Ala ;

Y représente un groupe ArgZ ou Z dans lequel Z est Trp-Gly-OH, Trp-OH, OH, rp-Gly-NH₂, Trp-NH₂ ou NH₂ ;

Hphé représente la dihydroxy-DPhénylalanine ou la DhomoPhénylalanine.

7/ Complexes nucléo-peptidiques selon la revendication 6, caractérisés en ce qu'ils sont choisis dans le groupe comprenant :

- 1) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-Arg-Trp-Gly-NH₂
- 2) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-Arg-Trp-NH₂
- 3) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-Arg-NH₂
- 4) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-NH₂
- 5) A-Ala-His-DhomoPhé-NH₂
- 6) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-Arg-Trp-Gly-OH
- 7) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-Arg-Trp-OH
- 8) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-Arg-OH
- 9) A-Nle-Ala-His-DhomoPhé-OH
- 10) A-Ala-His-DhomoPhé-OH
- 11) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-Arg-Trp-Gly-NH₂
- 12) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-Arg-Trp-NH₂
- 13) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-Arg-NH₂
- 14) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-NH₂
- 15) A-Ala-His-DihydroxyDPhé-NH₂
- 16) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-Arg-Trp-Gly-OH
- 17) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-Arg-Trp-OH
- 18) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-Arg-OH
- 19) A-Nle-Ala-His-DihydroxyDPhé-OH
- 20) A-Ala-His-DihydroxyDPhé-OH.

8/ Complexes nucléo-peptidiques selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisés en ce que au moins un acide aminé constitutif de la séquence est glycosylé.

9/ Compositions cosmétologiques ou pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent, à titre de substance active, au moins un complexe nucléo-peptidique selon l'une des revendications 1 à 8, en association avec un support pharmaceutiquement acceptable.

10/ Compositions cosmétologiques ou pharmaceutiques selon la revendication 9, caractérisées en ce qu'elles sont sous forme de solutions, de lotions, de sprays, de crèmes ou de gel.

11/ Compositions pharmaceutiques selon la revendication 9, caractérisées en ce qu'elles sont sous forme de préparations injectables.

~~12/ Utilisation des compositions cosmétologiques selon la revendication 9 ou 10, comme activateur de la mélanogénèse cutanée.~~

13/ Utilisation des complexes selon l'une des revendications 1 à 8 pour la préparation d'une composition pharmaceutique selon l'une des revendications 9 à 11 pour le traitement médical des troubles de la mélanogénèse.

14/ Compositions cosmétologiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent, à titre de substance active, au moins un complexe nucléopeptidique selon l'une des revendications 1 à 8, en association avec un support cosmétologiquement acceptable.

15/ Compositions cosmétologiques selon la revendication 14, caractérisées en ce qu'elles sont sous forme de solutions, de lotions, de sprays, de crèmes ou de gel.

16/ Utilisation des compositions cosmétologiques selon la revendication 14 ou 15, par voie topique en vue de l'accélération de la mélanogénèse de la peau et des cheveux.

17/ Utilisation des compositions cosmétologiques selon la revendication 14 ou 15, par voie topique pour le traitement préventif et curatif des érythèmes solaires.

REVENDICATIONS MODIFIEES

[reçues par le Bureau international le 27 février 1998 (27.02.98);
revendication 1 modifiée; autres revendications inchangées (1 page)]

1/ Complexes nucléo-peptidiques à activité mélanotrope obtenus par
synthèse, comprenant une séquence d'au moins trois acides aminés sous la forme D,
5 L ou DL, ladite séquence étant liée physiquement ou chimiquement à des acides
puriques, ou leurs dérivés de formule générale I :



dans laquelle N représente une base purique comprenant de 5 à 10 atomes de
carbone, R1 représente un radical alkyl en C1 ou C3.

10 2/ Complexes nucléo-peptidiques selon la revendication 1, caractérisés
en ce que les dérivés des acides puriques sont des acides xanthiques.

3/ Complexes nucléo-peptidiques selon la revendication 1 ou 2,
caractérisés en ce que la séquence d'acides aminés est liée à l'acide sous forme de sel,
d'ester ou d'amide.

15 4/ Complexes nucléo-peptidiques selon l'une des revendications 1 à 3,
caractérisés en ce que les acides puriques sont choisis dans le groupe comprenant :

- l'acide hypoxanthique ($\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_4\text{O}_3$)
- l'acide acétyl xanthique ($\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_4$)
- l'acide théobromine acétique ($\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_4$)
- 20 - l'acide théophylline acétique ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_4$)

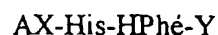
5/ Complexes nucléo-peptidiques selon l'une des revendications 1 à 4,
caractérisés en ce que la séquence est constituée de 3 acides aminés, et est choisie
dans le groupe comprenant :

Ala-His-HPhé

25 His-HPhé-Arg

où Hphé représente la dihydroxy-DPhénylalanine, la DhomoPhénylalanine.

6/ Complexes nucléo-peptidiques selon la revendication 5, caractérisés
en ce qu'ils répondent à la formule générale :



30 dans laquelle

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/01669

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K5/08 C07K5/10 C07K14/68 A61K38/04 A61K7/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A VON DUNGEN ET AL.: "Synthese von Strukturanalogen des Tetragastrins" JUSTUS LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE, no. 5, 1976, WEINHEIM DE, pages 860-875, XP002034383 see in particular the compounds 35-36, 48 and 57	1-4, 9-13
A	FR 2 624 374 A (INDUCHEM) 16 June 1989 see the whole document	1-17
A	WO 89 05818 A (CO PHARMA CORPORATION SRL) 29 June 1989 see the whole document	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents:**

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 January 1998

Date of mailing of the international search report

26/01/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01669

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2624374 A	16-06-89	CH 675967 A	30-11-90
		AU 2578488 A	15-06-89
		DE 3836849 A	22-06-89
		GB 2213376 A	16-08-89
WO 8905818 A	29-06-89	AU 3052889 A	19-07-89
		DE 3879191 A	15-04-93
		EP 0346460 A	20-12-89
		JP 2503006 T	20-09-90
		US 5110798 A	05-05-92

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 97/01669

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C07K5/08 C07K5/10 C07K14/68 A61K38/04 A61K7/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	A VON DUNGEN ET AL.: "Synthese von Strukturanalogen des Tetragastrins" JUSTUS LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE, no. 5, 1976, WEINHEIM DE, pages 860-875, XP002034383 *voir surtout les composés 35-36, 48 et 57*	1-4, 9-13
A	FR 2 624 374 A (INDUCHEM) 16 juin 1989 voir le document en entier	1-17
A	WO 89 05818 A (CO. PHARMA CORPORATION SRL) 29 juin 1989 voir le document en entier	1-17

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"A" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 janvier 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/01/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Masturzo, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 97/01669

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2624374 A	16-06-89	CH 675967 A	30-11-90
		AU 2578488 A	15-06-89
		DE 3836849 A	22-06-89
		GB 2213376 A	16-08-89
WO 8905818 A	29-06-89	AU 3052889 A	19-07-89
		DE 3879191 A	15-04-93
		EP 0346460 A	20-12-89
		JP 2503006 T	20-09-90
		US 5110798 A	05-05-92

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.